

学 位 論 文 題 名

Study of the stability of novel lysozyme
and α -lactalbumin

(新規リゾチーム/ α -ラクトルブミン属の安定性の解明)

学位論文内容の要旨

近年、遺伝子工学的手法の急激な発展により、タンパク質の特定位置のアミノ酸を本来とは異なるものに置換することや、さらには思いのままのアミノ酸配列を持ったポリペプチド鎖を創生することができるようになった。しかしながら、最終的に期待通りの構造や機能を持ったタンパク質の創生については、データの蓄積という域を脱するに至っていない。タンパク質のフォールディング問題は、セントラルドグマの解明に続く、第二の遺伝子情報の解析と考えられ近年世界中で精力的に研究がなされている。また、最終生成物である特定の立体構造を持つタンパク質の安定化因子の解明についてもいくつかの各論は提案されているが、今だ完全に理解しているというにはほど遠い状況である。

本研究では、これまでタンパク質の安定性やフォールディング研究にモデルタンパク質として多く用いられてきた α -ラクトルブミン、リゾチームを対象として研究を進めた。さらに、新たな知見を得るためにリゾチームは昆虫リゾチームであるカイコガリゾチーム、 α -ラクトルブミンにおいては、その構造構成要素である α -ドメインと β -ドメインをヒトとウシ由来のもので組換えたドメイン交換変異体を作成し研究を行った。

リゾチームは、その物理化学的側面及び機能についてこれまで多くの報告がなされている。しかしながら、これまで昆虫リゾチームについての物理化学的研究は報告されていない。一般的に、昆虫のリゾチームは、ヒトやニワトリのものと同一 c 型リゾチームに分類され、脊椎動物の c 型リゾチームと比べ 9-10 残基短い。カイコガリゾチームについては一次構造相同性もニワトリのものに比べ 40% 程度であることが知られている。そのため、構造安定性及び機能について脊椎動物のリゾチームとの違いが期待され、その結果は今後のタンパク工学的研究の発展に寄与するものと考えられる。

カイコガリゾチームについてその安定性および、リゾチームのひとつの基質である N-アセチルグルコサミン 5 量体、PNP-(GlcNAc)₅、の切断様式についての研究を行った。

カイコガリゾチームの安定性を調べるために、高感度示差走査熱量計による熱変性測定を行った。その結果、カイコガリゾチームの変性温度はヒト及びニワトリ卵白リゾチームと比べ 17-26 °C 低いことがわかった。また、変性に伴う熱容量変化およびエントロピー変化もヒトリゾチームより低いことがわかった。さらに、変性剤として知られている尿素及びグアニジン塩酸塩に対しても同様に、これまで報告されてきた脊椎動物由来のリゾチームよりも低い安定性を示した。また、機能的側面についての研究の結果、溶菌活性には大差がないものの、単純基質である PNP-(GlcNAc)₅ に対する活性は、脊椎動物のものより低いことがわかった。その結合様式は糖鎖が結合する 6 つのサブサイト (A-F) のうち脊椎動物のリゾチームが A-E 結合様式が優勢であるのに対し、カイコガリゾチームでは明らかに B-F 結合様式が優勢であることがわかった。

α -ラクトアルブミンは、 α -ドメイン (1-34, 86-123) と β -ドメイン (35-85) から

なるアミノ酸 123 残基、分子量約14000 の球状タンパク質である。また、 α -ラクトアルブミンはカルシウム結合蛋白質であり、2つのドメイン間にタンパク1分子あたり1つのカルシウムを結合している。

今回、ヒト及びウシの α -ラクトアルブミンよりそのドメイン交換キメラタンパク質を構築した。目的タンパク質は、大腸菌を宿主としてインクルージョンボディとして発現することができた。各ドメイン構成要素の組み合わせは天然の1次構造を含めると8種類あり、そのうち6種類において効率的に巻き戻すことができた。それぞれの組み換え体の立体構造は近紫外及び遠紫外 CD シグナルよりほぼ天然の α -ラクトアルブミンと同じものと推定された。また、すべての組み換えタンパク質は、ガラクトシルトランスフェラーゼに結合しその基質特異性を変化させる本来の機能を有していた。

構築したタンパク質の安定性を評価するために、高感度示差走査熱量計を用いて天然のものを含むすべてのタンパク質の熱測定を行った。その結果、大腸菌より産生された天然型 α -ラクトアルブミンはウシ、ヒトの両方で天然のものより不安定であった。N末端に付加したメチオニン残基の影響であることが推測できる。さらに、メチオニン残基の付加に伴う安定性の減少は双方で異なり、ウシ α -ラクトアルブミンに比べヒト α -ラクトアルブミンの方が著しく安定性が低下していた。

しかしながら、ヒト α -ドメインとウシ β -ドメインで構成されているキメラ α -ラクトアルブミン (HBH) はN末端メチオニン残基が付加しているにもかかわらず、天然型の α -ラクトアルブミンとは異なりミルクより精製された天然のものより高い安定性を示した。さらに、同様に大腸菌より産生された天然型 α -ラクトアルブミンと比べると最大約 20℃もの変性温度の増加が観測された。ヒト α -ラクトアルブミンの α -ドメインのN末端領域(1-34)のみを導入したキメラタンパク質 (HBB) も HBH とほぼ同等の安定性を示すことより、ヒト α -ラクトアルブミンの α -ドメインのN末端領域とウシ β -ドメインの組み合わせにより安定性の高いキメラ α -ラクトアルブミンを構築することができることを示すことができた。このことは、タンパク質の安定化に対して、ドメイン交換という方法が1つの有効な戦略となりうることを提案するものである。

続いて、 α -ラクトアルブミンの巻き戻り中間体と考えられているモルテングロビュール状態の安定性を評価するためにカルシウム非存在下でのアポ α -ラクトアルブミンのグアニジン塩酸塩による変性実験を行った。常温において、その結合カルシウムを取り除くことにより、 α -ラクトアルブミンは中性 pH かつ低イオン強度の条件下ではモルテングロビュール状態をとることが知られている。これまで、 α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態において α -ドメインのトポロジーは天然と同じ程度に保存されており、 β -ドメインは崩壊していることが示唆されてきた。今回の研究において、ヒト α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態はウシのものよりも安定であった。さらに、ヒト α -ラクトアルブミンの α -ドメインとウシ β -ドメインからなるキメラタンパク質 HBH のモルテングロビュール状態の安定性はヒト α -ラクトアルブミンのものと同等であった。

従って、 α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態の安定性は α -ドメインのみによって決定されており、そのことは α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態において α -ドメインのみが構造を形成していることを示している。

以上、本研究によって変温動物である昆虫のリゾチームが恒温動物のリゾチームより熱的に不安定であり、活性にも質的な差があること、 α -ラクトアルブミンの熱安定性がドメインシャッフリングによって向上しうること、モルテングロビュール状態では α -ドメインの構造形成が重要であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	新 田 勝 利
副 査	教 授	田 中 勲
副 査	教 授	山 岸 皓 彦
副 査	助教授	出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Study of the stability of novel lysozyme and α -lactalbumin

(新規リゾチーム/ α -ラクトルブミン属の安定性の解明)

本研究では、これまでタンパク質の安定性やフォールディング研究にモデルタンパク質として多く用いられてきた同族タンパク質、 α -ラクトルブミン～リゾチームの系を対象とした。さらに、新たな知見を得るためにリゾチームは昆虫リゾチームであるカイコガリゾチーム、 α -ラクトルブミンにおいては、その構造構成要素である α -ドメインと β -ドメインをヒトとウシ由来のもので組換えたドメイン交換変異体を作成し研究を行った。

リゾチームは、その物理化学的側面及び機能についてこれまで多くの報告がなされている。しかしながら、これまで昆虫リゾチームについての物理化学的研究は報告されていない。一般的に、昆虫のリゾチームは、ヒトやニワトリのものと同一 c 型リゾチームに分類され、脊椎動物の c 型リゾチームと比べ 9-10 残基短い。カイコガリゾチームについては一次構造相同性もニワトリのものに比べ 40% 程度であることが知られている。そのため、構造安定性及び機能について脊椎動物のリゾチームとの違いが期待され、その結果は今後のタンパク工学的研究の発展に寄与するものと考えられる。

カイコガリゾチームの安定性の研究の結果、カイコガリゾチームの変性温度はヒト及びニワトリ卵白リゾチームと比べ 17-26 °C 低いことがわかった。また、変性に伴う熱容量変化ヒトリゾチームより低いことがわかった。また、機能的側面についての研究の結果、溶菌活性には大差がないものの、単純基質である PNP-(GlcNAc)₅ に対する結合様式は糖鎖が結合する 6 つのサブサイト (A-F) のうち脊椎動物のリゾチームが A-E 結合様式が優勢であるのに対し、カイコガリゾチームでは明らかに B-F 結合様式が優勢であることがわかった。

α -ラクトアルブミンは、 α -ドメイン (1-34, 86-123) と β -ドメイン (35-85)

からなるアミノ酸 123 残基、分子量約 14000 の球状タンパク質である。また、 α -ラクトアルブミンはカルシウム結合蛋白質であり、2つのドメイン間にタンパク 1 分子あたり 1つのカルシウムを結合している。

申請者はヒト及びウシの α -ラクトアルブミンよりそのドメイン交換キメラタンパク質を構築した。構築したキメラタンパク質の安定性を評価するために天然のものを含むすべてのタンパク質の熱測定を行った。ヒト α -ドメインとウシ β -ドメインで構成されているキメラ α -ラクトアルブミン (HBH) は N 末端メチオニン残基が付加しているにもかかわらず、天然型の α -ラクトアルブミンとは異なりミルクより精製された天然のものより高い安定性を示した。ヒト α -ラクトアルブミンの α -ドメインの N 末端領域 (1-34) のみを導入したキメラタンパク質 (HBB) も HBH とほぼ同等の安定性を示すことより、ヒト α -ラクトアルブミンの α -ドメインの N 末端領域とウシ β -ドメインの組み合わせにより安定性の高いキメラ α -ラクトアルブミンを構築することができることを示すことができた。このことは、タンパク質の安定化に対して、ドメイン交換という方法が 1つの有効な戦略となりうることを提案するものである。

以上、本研究によって変温動物である昆虫のリゾチームが恒温動物のリゾチームより熱的に不安定であること、活性にも質的な差があること、 α -ラクトアルブミンの熱安定性がドメインシャッフリングによって向上しうること、モルテングロビュール状態では α -ドメインの構造形成が重要であることが示された。

学位論文の公开发表の質疑応答では、申請者は自ら行った実験の結果や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。

以上のように申請者は、球状タンパク質の立体構造形成機構についてリゾチーム~ α -ラクトアルブミン系を用いていくつかの重要な知見を示した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格が充分にあるものと認定した。